(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년12월09일
(11) 등록번호 10-1091041
(24) 등록일자 2011년12월01일

(51) Int. Cl.
C07K 14/575 (2006.01) *C12N 15/16* (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0073143
(22) 출원일자 2010년07월29일
심사청구일자 2010년07월29일
(56) 선행기술조사문헌
Gastroenterology, Vol. 137, No. 6, pp. 2146~2157 (2009)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
성재영
서울특별시 노원구 중계1동 롯데우성아파트 103동 1205호
문미진
경기도 과천시 원문동 래미안 슈르 아파트 319동 602호
황종익
서울특별시 성북구 하월곡동 224 샹그레빌아파트 102-406
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 손영희

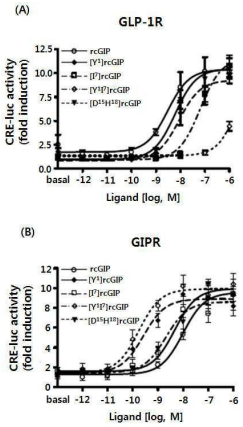
(54) 새로운 재조합 글루코스 의존성 인슐린분비 펩타이드(ｒｃＧＩＰ) 작용제 및 그 용도

(57) 요 약

본 발명은 새로운 재조합 글루코스 의존성 인슐린분비 펩타이드 작용제의 개발과 그 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 글루카곤 유사펩타이드-1 수용체(GLP-1R) 및 글루코스 의존성 인슐린분비 펩타이드 수용체(GIPR)에 동시에 작용하는 화학식 I의 아미노산 서열을 포함하는 GIP 화합물에 관한 것이다.

본 발명에 따라 제조된 재조합 GIP(rcGIP) 작용제는 펩타이드 분해효소 DPP-IV에 저항성이 있으며, GLP-1 및 GIP 수용체를 동시에 활성화시킬 수 있다. 따라서 본 발명의 rcGIP 작용제는 하나의 수용체에 단독으로 작용하는 작용제와는 다르게, 췌장의 베타 세포에서 효과적으로 인슐린을 분비시킬 수 있으므로, 1형 및 2형 당뇨병 치료에 매우 효과적일 것으로 사료될 뿐만 아니라, 비만 치료 및 골다공증 치료에도 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010K000818
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 뇌프론티어사업단
연구사업명 21C프론티어사업
연구과제명 신규 GPCR표적 리간드 및 GPR92 기능 조절 전임상 후보물질 발굴
기여율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 Ⅰ의 아미노산 서열을 포함하는 재조합 GIP 화합물:

[화학식 Ⅰ]

Xaa1-Ser-Glu-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Tyr-Thr-Ile-Ala-Met-Xaa15-Lys-Ile-Xaa18-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-R

상기 식에서, Xaa1은 His 또는 Tyr이고, Xaa7은 Thr 혹은 Ile이고, Xaa15는 Glu 또는 Asp이고, Xaa18은 Ala 혹은 His이고, R은 Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH_2 또는 NH_2이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 GIP 화합물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 GIP 화합물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 GIP 화합물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 GIP 화합물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 GIP 화합물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 GIP 화합물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 GIP 화합

물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 펩타이드 분해효소에 대해 저항성을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 GIP 화합물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체를 동시에 활성화시키는 것을 특징으로 하는 재조합 GIP 화합물.

청구항 11

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 재조합 GIP 화합물을 유효성분으로 함유하는 1형 및 2형 당뇨병 치료용 약제 조성물.

청구항 12

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 한의 재조합 GIP 화합물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 및 비만 치료용 약제 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 새로운 재조합 글루코스 의존성 인슐린분비 펩타이드 작용제의 개발과 그 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 글루카곤 유사펩타이드-1 수용체(GLP-1R) 및 글루코스 의존성 인슐린분비 펩타이드 수용체(GIPR)에 동시에 작용하는 화학식 I 의 아미노산 서열을 포함하는 GIP 화합물 및 그의 의학적 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 장에서 분비되는 어떤 효소가 췌장의 내분비 기능을 조절할 수 있다는 발견 이후 [Moore and Abram, Biochem J 1:28-38, 1906], 장에서 유래한 인슐린을 분비하는 물질(incretin, 인크레틴)이라는 개념이 성립되었다 [Fehmann et al., Endocr Rev 16:390-410, 1995]. 인크레틴은 장에서 분비되는 호르몬으로, 장내 영양분 흡수에 반응하여, 글루코스 농도에 의존적으로 췌장에서 인슐린의 분비를 조절한다. 글루카곤 유사펩타이드-1(glucagon-like peptide-1; GLP-1)과 글루코스 의존적 인슐린분비 펩타이드(glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GIP)는 대표적인 인크레틴이다 [Fehmann et al., Endocr Rev 16:390-410, 1995]. GLP-1은 30 개의 아미노산으로 구성된 펩타이드이며 소장의 L 세포에서 분비되는 반면, GIP는 42 개의 아미노산으로 구성되며 소장의 K 세포에서 분비된다 [Orskov et al., Endocrinology 119:1467-1475, 1986; Orskov et al., Diabetologia 30:874-881, 1987]]. GLP-1과 GIP는 췌장 베타세포에 존재하는 GLP-1 수용체와 GIP 수용체를 통해서 인슐린 분비를 조절한다.

[0003] GLP-1의 인슐린 분비효과는 여러 당뇨병 동물모델에서 증명되었으며 [Shen et al., Metabolism 47:1042-1047, 1998; Drucker, Endocrinology 142:521-527, 2001; MacDonald et al., Diabetes 51 Suppl 3:S434-442, 2002], GLP-1은 베타세포에서 인슐린의 분비뿐만 아니라, 인슐린의 합성, 베타세포의 성장을 촉진하고, 베타세포 사멸에는 억제효과가 있음이 밝혀졌다 [Fehmann et al., Endocrinology 130:159-166, 1992; Perfetti et al., Eur J Endocrinol 143:717-725, 2000; Xu et al., Diabetes 48:2270-2276, 1999; Stoffers et al., Diabetes 49:741-748, 2000; List et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 286:E875-881, 2004; Perfetti et al., Endocrinology 141:4600-4605, 2000; Drucker, Mol Endocrinol 17:161-171, 2003]. 또한 GLP-1은 췌장 알파세

포에서 글루카곤의 분비를 글루코스 농도 의존적으로 억제한다 [Nauck et al., J Clin Endocrinol Metab 87:1239-1246, 2002]. GLP-1은 이러한 인슐린 분비 효과뿐만 아니라, 내장기관과 중추신경계에서도 당뇨병과 관련된 중요한 역할을 한다. GLP-1은 내장기관에서 영양분이 소실되는 것을 억제하고 글루코스 수준을 조절하며 [Nauck et al., Am J Physiol 273:E981-988, 1997], 중추신경계에서는 식욕을 억제하는 작용을 하여 궁극적으로 체중을 감소시키는 기능이 있다 [Zander et al., Lancet 359:824-830, 2002]. GLP-1의 이러한 다양한 기능은 궁극적으로 체내에서 올라간 혈당을 정상화하는데 기여하게 된다. 실제로 GLP-1을 2형 당뇨환자의 피하에 주사하면, 인슐린 분비를 촉진하고, 혈당을 낮추는 효과를 보인다 [Gutniak et al., N Engl J Med 326:1316-1322, 1992 Nauck et al., Diabetologia 36:741-744, 1993]. GLP-1이 다른 저혈당 유도 치료제보다 좋은 점은, GLP-1이 혈당에 의존적으로 활성을 가지기 때문에 저혈당을 유도하지 않는 다는 것이다. 또한 설포닐우레아(sulphonylurea) 약물에 더 이상 반응하지 않는 환자에서 인슐린을 분비시킬 수 있는 장점을 가진다 [Nauck et al., Diabetes Care 21:1925-1931, 1998].

[0004] GLP-1과 마찬가지로 GIP도 베타세포에서 글루코스 의존적으로 인슐린 분비를 자극시킬 뿐만 아니라 인슐린의 합성을 촉진하고, 베타세포 증식을 유도하며, 사멸에는 억제적인 효과를 가지고 있다 [Trumper et al., Mol Endocrinol 15:1559-1570, 2001]. 최근 GIP가 과발현 되도록 만든 유전자 도입 생쥐에서 골밀도와 골내 무기질이 증가되었다는 사실이 보고되었다 [Xie et al., Bone 40:1352-1360, 2007]]. 이는 GIP가 인슐린 분비를 유도하는 기능 외에도 골밀도를 증가시킬 수 있으며, 이에 따라 골다공증 예방 및 치료제로 사용할 수 있는 가능성을 보여주는 결과이다.

[0005] 그러나, GLP-1과 GIP 그 자체를 당뇨병 치료에 사용하는 데에는 제한이 있다. GLP-1과 GIP 모두 혈액에 존재하는 이펩타이드 분해효소-IV(dipeptidyl peptidase-IV; DPP-IV)에 의해 분해되어, in vivo 및 in vitro에 매우 짧은 반감기를 가지고 있다 [Mentlein et al., Eur J Biochem 214:829-835, 1993 Kieffer, et al., Endocrinology 136:3585-3596, 1995]. DPP-IV는 펩타이드 N-말단(N-terminal)의 두 번째 아미노산이 프롤린(proline) 이거나, 알라닌(alanine)일 경우 이 자리를 분해한다.

[0006] 한편, 최근에 독도마뱀의 침샘에서 발견된 익센딘-4(exendin-4)가 GLP-1 수용체에 높은 활성을 가지는 작용제임이 밝혀졌고, 임상시험에 적용되고 있다 [Buse et al., Diabetes Care 27:2628-2635, 2004]. 익센딘-4(exendin-4)는 39 개의 아미노산으로 구성되며, GLP-1과 약 50% 정도 유사도를 보이며, GLP-1 보다 C-말단에 9 개 아미노산이 추가된 형태의 펩타이드이다. C-말단에 추가된 9 개 아미노산이 GLP-1 수용체와의 결합력을 높여주는 것으로 알려지고 있다. 또한 익센딘-4는 N-말단의 두 번째 아미노산이 글리신(glycine)으로 되어 있어 DPP-IV에 상대적으로 저항성이 높아, 혈중에서 생체유래 GLP-1보다 긴 반감기를 가지는 장점이 있다 [Edwards et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 281:E155-161, 2001]. 하지만, 익센틴-4는 인간유래 GLP-1과 아미노산 서열이 차이를 보여 인간에 주사했을 때, 항체가 형성될 가능성이 높은 단점이 있다 [Baggio et al., Diabetes. 55:1562-1570, 2006]. 따라서 DPP-IV에 저항성이 있으면서 GLP-1 수용체뿐만 아니라, GIP 수용체의 활성을 유도한다면 인슐린분비 조절에서 상승효과를 가져올 수 있을 것으로 사료된다. GLP-1과 익센딘-4(exendin-4) 및 GIP의 아미노 말단 부분은 비교적 높은 아미노산 상동성을 보이며, 가운데 위치한 알파-헬릭스 모양을 이루는 부위와, 카르복시 말단은 아미노산 서열에서 많은 차이를 보인다. 아미노 말단에서, GIP의 1, 7번째 아미노산이 같은 위치의 GLP-1 및 익센딘-4와 차이를 보인다. 중앙의 알파-헬릭스 부위의 11, 22, 25번째 아미노산은 세 종류의 펩타이드에서 모두 동일하지만, 15, 18번째 GLP-1과 익센딘-4에서는 동일한 반면 GIP에서는 차이를 보인다. 상기 언급한 5 개의 아미노산은 펩타이드의 알파-헬릭스 구조에서 같은 면에 존재하며, 리간드-수용체의 결합에 중요하다고 알려져 있다 [Adelhorst et al., J Biol Chem 269:6275-6278, 1994; Gallwitz et al., Eur J Biochem 225:1151-1156, 1994]. GIP와 GLP-1의 아미노산의 차이는, 이러한 아미노산들이 각각의 수용체와의 결합에서 리간드 선택성에 관여할 것이라는 것을 시사한다. 또한 익센딘-4(exendin-4)의 꼬리는 익센딘-4와 GLP-1 수용체의 세포외(extracellular) 부분과의 친화력을 높인다고 알려져 있다 [Al-Sabah and Donnelly, Br J Pharmacol 140:339-346, 2003].

[0007] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, GIP에 GLP-1의 아미노산인 1, 7, 15 및 18번째 아미노산과 익센딘-4(exendin-4)의 꼬리 부분을 도입하여 재조합 GIP(rcGIP)를 제조하는 경우, 상기 재조합 GIP는 GLP-1 수용체와 GIP 수용체 모두에 작용 할뿐만 아니라, 펩타이드 분해효소에 저항성을 가짐을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 주된 목적은 생체에서 펩타이드 분해효소에 저항성을 가져 생체내 분해시간을 늦추면서, GLP-1 및 GIP 수용체에 동시에 작용하는 장점을 갖는 새로운 GIP 작용제를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 새로운 GIP 작용제를 포함하는 당뇨병 치료제, 골다공증 및 비만 치료제를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 Ⅰ의 아미노산 서열을 포함하는 재조합 GIP(rcGIP) 화합물을 제공한다.

[0011] [화학식 Ⅰ]

[0012] Xaa1-Ser-Glu-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Tyr-Thr-Ile-Ala-Met-Xaa15-Lys-Ile-Xaa18-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-R

[0013] 상기 식에서, Xaa1은 His 또는 Tyr이고, Xaa7은 Thr 혹은 Ile이고, Xaa15는 Glu 또는 Asp이고, Xaa18은 Ala 혹은 His이고, R은 Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH2 또는 NH2이다.

[0014] 본 발명의 상기 rcGIP 화합물의 아미노산 서열은 당 업계 관례에 따라, GIP의 아미노 말단의 잔기를 1번으로 지정하고, 다른 아미노산을 연속적으로 번호를 매겼다.

[0015] 본 발명에서는 GIP의 아미노산 서열에서 펩타이드 분해효소에 저항성을 가지는 아미노산을 도입하여 생체내 분해가 잘 일어나지 않게 하였으며, GLP-1의 아미노산과 익센딘-4(exendin-4)에서 유래한 C-말단 아미노산을 추가하여 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 공동으로 작용하는 작용제를 개발하였다.

[0016] 본 발명의 상기 rcGIP 화합물은 서열번호 1(표 1의 rcGIP)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 GIP 화합물은 DPP-IV에 대한 저항성을 주기 위해 2번째 아미노산을 세린(Serine)으로 치환하고, GLP-1 수용체에 대한 활성도를 높이기 위해 1번째 아미노산을 히스티딘(Histidine)으로 치환하고, 7번째 아미노산을 트레오닌(Threonine)으로 치환하고, 15번째 아미노산을 글루탐산(Glutamic acid)로 치환하고, 18번째 아미노산을 알라닌(Alanine)으로 치환하였으며, 30번째 아미노산 이후부터 C-말단의 12개 아미노산을 제거하였다.

[0017] 본 발명에 따른 상기 rcGIP 화합물은 서열번호 2(표 1의 [Y^{1}]rcGIP)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 GIP 화합물은 DPP-IV에 대한 저항성을 주기 위해 2번째 아미노산을 세린(Serine)으로 치환하고, GLP-1 수용체에 대한 활성도를 높이기 위해 7번째 아미노산을 트레오닌(Threonine)으로 치환하고, 15번째 아미노산을 글루탐산(Glutamic acid)로 치환하고, 18번째 아미노산을 알라닌(Alanine)으로 치환하였으며, 30번째 아미노산 이후부터 C-말단의 12개 아미노산을 제거하였다.

[0018] 본 발명의 상기 rcGIP 화합물은 서열번호 3(표 1의 [I^{7}]rcGIP)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 GIP 화합물은 DPP-IV에 대한 저항성을 주기 위해 2번째 아미노산을 세린(Serine)으로 치환하고, GLP-1 수용체에 대한 활성도를 높이기 위해 1번째 아미노산을 히스티딘(Histidine)으로 치환하고, 15번째 아미노산을 글루탐산(Glutamic acid)로 치환하고, 18번째 아미노산을 알라닌(Alanine)으로 치환하였으며, 30번째 아미노산 이후부터 C-말단의 12개 아미노산을 제거하였다.

[0019] 본 발명의 rcGIP 화합물에 있어서, 상기 GIP 화합물은 서열번호 4(표 1의 [$Y^{1}I^{7}$]rcGIP)의 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 GIP 화합물은 DPP-IV에 대한 저항성을 주기 위해 2번째 아미노산을 세린(Serine)으로 치환하고, GLP-1 수용체에 대한 활성도를 높이기 위해 15번째 아미노산을 글루탐산(Glutamic acid)로 치환하고, 18번째 아미노산을 알라닌(Alanine)으로 치환하였으며, 30번째 아미노산 이후부터 C-말단의 12개 아미노산을 제거하였다.

[0020] 본 발명의 rcGIP 화합물에 있어서, 상기 GIP 화합물은 서열번호 5(표 1의 [$D^{15}H^{18}$]rcGIP)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 GIP 화합물은 DPP-IV에 대한 저항성을 주기 위해 2번째 아미노산을 세린(Serine)으로 치환하고, GLP-1 수용체에 대한 활성도를 높이기 위해 1번째 아미노산을 히스티딘(Histidine)으로

치환하고, 7번째 아미노산을 트레오닌(Threonine)으로 치환하였으며, 30번째 아미노산 이후부터 C-말단의 12개 아미노산을 제거하였다.

[0021] 본 발명에 따른 상기 rcGIP 화합물은 서열번호 6(표 1의 [Y^1]rcGIP-E4)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 GIP 화합물은 DPP-IV에 대한 저항성을 주기 위해 2번째 아미노산을 세린(Serine)으로 치환하고, GLP-1 수용체에 대한 활성도를 높이기 위해 7번째 아미노산을 트레오닌(Threonine)으로 치환하고, 15번째 아미노산을 글루탐산(Glutamic acid)로 치환하고, 18번째 아미노산을 알라닌(Alanine)으로 치환하였으며, 30번째 아미노산 이후부터 익센딘-4(exendin-4) C-말단의 G-P-S-S-G-A-P-P-P-S의 10개 아미노산을 추가하였다.

[0022] 본 발명에 따른 상기 rcGIP 화합물은 서열번호 7([Y^1I^7]rcGIP-E4)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 GIP 화합물은 DPP-IV에 대한 저항성을 주기 위해 2번째 아미노산을 세린(Serine)으로 치환하고, GLP-1 수용체에 대한 활성도를 높이기 위해 15번째 아미노산을 글루탐산(Glutamic acid)로 치환하고, 18번째 아미노산을 알라닌(Alanine)으로 치환하였으며, 30번째 아미노산 이후부터 익센딘-4(exendin-4) C-말단의 G-P-S-S-G-A-P-P-P-S의 10개 아미노산을 추가하였다.

[0023] 본 발명의 상기 rcGIP 화합물은 DPP-IV와 같은 펩타이드 분해효소에 대해 저항성을 갖으며, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체를 동시에 활성화(즉, 작용제로 기능)시키는 것을 특징으로 한다.

[0024] 구체적으로 본 발명의 실시예에서 확인한 바와 같이, GIP의 1번째 Tyr, 7번째 Ile, 15번째 Asp 및 18번째 His가 GLP-1의 His, Thr, Glu 및 Ala로 치환시킨 재조합 GIP(rcGIP)의 펩타이드 효능을 측정하는 경우, GLP-1 수용체 및 GIP 수용체를 활성화시켰다. 따라서 본 발명의 rcGIP는 GLP-1 수용체에 대한 결합력을 높일 뿐만 아니라, GIP 수용체 또한 여전히 활성화 시킨다.

[0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 GIP 화합물을 유효성분으로 함유하는 1형 및 2형 당뇨병 치료용 약제 조성물을 제공한다.

[0026] GLP-1 수용체, GIP 수용체의 활성화 및 1형 및 2형 당뇨병 치료와의 연관성이 알려져 있다 [Drucker & Nauck et al., Lancet 368:1696-1705, 2006; Meier & Nauck et al., Horm Metab Res 36:859-866, 2004]. 따라서 본 발명에 따른 재조합 GIP 화합물은 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체 모두에 결합력이 높을 뿐만 아니라, 효과적으로 인슐린을 분비시킴으로 1형 및 2형 당뇨병을 예방 및 치료할 수 있다.

[0027] 구체적으로 본 발명의 실시예에서 확인한 바와 같이, 본 발명의 재조합 GIP를 췌장의 베타 세포에 처리하는 경우 인슐린 분비를 효과적으로 촉진시켰다.

[0028] 본 발명의 상기 새로운 재조합 GIP는 GIP, GLP-1 및 익센딘-4(exendin-4) 아미노산 서열에 기초하여 DPP-IV에 저항성이 있도록 설계 되었으며, GLP-1과 GIP 수용체에 공통으로 작용하여 인슐린 분비에 상승효과를 유도하도록 설계되었다. 또한 본 발명의 새로운 작용제에 DPP-IV에 대한 저항성을 주기 위해 2번째 아미노산을 모두 세린(Serine)으로 치환하였다. 인간 GLP-1과 익센딘-4(exendin-4) 및 인간 GIP의 아미노산 서열을 비교해 보았을 때, 아미노 말단 부위에서 GIP의 1번째 타이로신(Tyrosine), 7번째 아이소루신(Isoleucine)이 각각 GLP-1과 익센딘-4의 1번째 히스티틴(Histidine), 7번째 트레오닌(Threonine)과 차이를 보이는 것을 볼 수 있다. 또한 펩타이드의 중앙 부위에 있는 알파-헬릭스의 표면에 존재하고, 리간드-수용체의 결합에 중요하다고 알려진 다섯 개의 아미노산 중에서 11번째 세린(Serine), 22번째 페닐알라닌(Phenylalanine) 및 25번째 트립토판(Tryptophan)은 GLP-1, 익센딘-4(exendin-4) 및 GIP에서 공통으로 존재하지만, 15번째 글루탐산(Glutamic acid), 18번째 알라닌(Alanine)은 GLP-1과 익센딘-4에서는 동일하고, 15번째 아스파라긴산(Aspartic acid)와 18번째 히스티틴(Histidine)인 GIP와는 다르다. 이에, GLP-1과 GIP 수용체에 공통으로 작용하게 하기 위해, 1번째 아미노산은 GLP-1에서 유래한 히스티틴(Histidine) 또는 GIP에서 유래한 타이로신(Tyrosine)으로 하였으며, 7번째 아미노산은 GLP-1에서 기원한 트레오닌(Threonine) 또는 GIP의 아이소루신(Isoleucine)으로 하였다. 그리고 15번째 아미노산은 GLP-1에서 유래한 글루탐산(Glutamic acid) 또는 GIP에서 기원한 아스파라긴산(Aspartic acid)로 하였으며, 18번째 아미노산은 GLP-1의 알라닌(Alanine) 또는 GIP에서 유래한 히스티틴(Histidine)으로 하였다. 30번째 아미노산 이후부터 C-말단의 12개 아미노산을 제거하고, 익센딘-4(exendin-4) C-말단의 G-P-S-S-G-A-P-P-P-S의 10개 아미노산을 추가하거나 이들 C-말단을 추가하지 않았다. 그리고 모든 C-말단은 NH_2를 추가하여 아미데이션 하였다.

[0029] 본 발명의 재조합 GIP 화합물은 종래 알려진 통상의 고상 펩티드 합성 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 펩티드

합성기는 예컨대, 어플라이드 바이오시스템(Applied Biosystem, 캘리포니아주 포스터시티)으로부터 상업적으로 시판된다. 고상 합성을 위한 시약은 예컨대, 미드웨스트 바이오텍(Midwest Biotech, 인디애나주 피셔)으로부터 상업적으로 시판된다. 고상 펩티드 합성기는 간섭기를 차단, 반응에 대해 아미노산을 보호, 커플링(coupling), 디커플링 및 반응하지 않는 아미노산을 캡핑(capping)하기 위해 제조사의 지시에 따라 사용할 수 있다. 통상적으로, α-N-카바모일 보호된 아미노산 및 수지 상에서 성장하는 펩티드 쇄의 N-말단 아미노산은 실온의 불활성 용매, 예컨대 디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈 또는 염화 메틸렌 중에서 디시클로헥실카르보디이미드 및 1-히드록시벤조트리아졸과 같은 커플링제 및 디이소프로필에틸아민과 같은 염기 존재 하에 커플링된다. α-N-카바모일 보호기를 트리플루오로아세트산 또는 피페리딘과 같은 시약을 사용하여 생성된 펩티드 수지로부터 제거하고, 커플링 반응을 그 다음의 원하는 N-보호된 아미노산을 사용하여 반복하여 펩티드 쇄에 첨가한다. 적합한 아민 보호기는 당업계에 공지되어 있고, 예컨대 전체 교시가 참고로 인용된 그린(Green) 및 웃츠(Wuts)의 Protecting Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, 1991에 기재되었다. 예로는 t-부틸옥시카르보닐(tBOC) 및 플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc)이 있다.

[0030] GLP-1은 베타 세포의 조절을 통하여 인슐린 분비를 촉진하고, 글루카곤의 분비를 억제하기 때문에 2형 당뇨병 치료제로서 새롭게 주목 받고 있다 [Gutniak et al., N Engl J Med 326:1316-1322, 1992; Nauck et al., J Clin Endocrinol Metab 76:912-917, 1993]. 그러나, 혈액 내에서 매우 짧은 반감기 때문에 치료제로서의 사용이 제한적이다 [Deacon et al., Diabetes 44:1126-1131, 1995; Ritzel et al., Diabetologia 38:720-725, 1995]. 이에, 당뇨병 치료제로서 DPP-IV 억제제 또는 DPP-IV에 저항성을 가지는 GLP-1 유사체를 개발하는 연구가 수행되었으며 [Gallwitz et al., Regul Pept 86:103-111, 2000; Deacon et al., Diabetologia 41:271-278, 1998], 이중 DPP-IV 억제제는 GLP-1의 혈중 분해를 막아 정상 혹은 당뇨병 모델 동물에서 인슐린 분비를 촉진하고 혈중 글루코스 농도를 낮추는 효과가 있다 [Ahren et al., Diabetes Care 25:869-875, 2002; Pauly et al., Metabolism 48:385-389, 1999; Holst et al., Diabetes 47:1663-1670, 1998; Deacon et al., Diabetes 47:764-769, 1998]. 하지만, DPP-IV가 GLP-1 뿐만 아니라 다양한 조절 펩타이드를 분해하는 효과가 있기 때문에, DPP-IV의 사용은 여러 조절 펩타이드의 분해를 억제하게 되어, 결과적으로 여러 부작용을 초래할 가능성이 높다. 반면, GLP-1 유사체는 다른 조절 펩타이드 분해에 영향을 미치지 않으며, GLP-1 수용체에 특이적으로 반응하므로, 당뇨병 치료제로써 DPP-IV을 사용하는 것보다 장점이 있다.

[0031] GIP는 GLP-1과는 별도로, 또 다른 인크레틴으로 알려져 있으며, 베타 세포에 존재하는 GIP 수용체를 통하여 작용한다. 본 발명에서 확인한 바와 같이, GIP 및 GLP-1은 그들 고유의 수용체에 대해서만 활성을 유도하는 것을 확인하였다. 그러나, GLP-1과 GIP는 인슐린 분비에 있어서 상승효과를 유도하므로, GLP-1과 GIP 수용체에 동시에 작용할 수 있는 작용제는 효과적인 당뇨병 치료제로 사용될 가능성이 있다. 이에 따라, 본 발명에서는 상기와 같은 rcGIP를 제조하였으며, 이러한 rcGIP는 농도 의존적으로 GLP-1 및 GIP 수용체의 활성을 유도하였다. 또한, 이들 펩타이드들은 인슐린을 분비하는 insulinoma INS-1 세포에서 인슐린을 효과적으로 분비시킬 수 있음을 보였다. 따라서 본 발명의 rcGIP는 효과적인 당뇨병 치료제로써 사용가능할 것으로 사료된다.

[0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명에 따른 재조합 GIP 화합물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 및 비만 치료용 약제 조성물을 제공한다.

[0033] GIP는 골밀도를 증가시키며 [Xie et al., Bone 40:1352-1360, 2007], GLP-1은 중추신경계에서 식욕을 억제시키는 작용을 하는 것이 알려져 있으므로 [Zander et al., Lancet 359:824-830, 2002], 따라서 본 발명에 따른 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체를 동시에 활성화시키는 재조합 GIP 화합물은 골다공증 및 비만을 예방 및 치료할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여형태로 제형화할 수 있다. 경구 투여용 제형으로는 예를 들면, 정제, 환제, 경.연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘리시르제 (elixirs) 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예컨대, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 또는 글리신), 활택제 (예컨대, 실리카, 탈그, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리게이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알길산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0035] 또한 재조합 GIP(rcGIP) 펩타이드 및 그의 유사체를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비

경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 rcGIP 펩타이드 및 이의 유사체를 안정화 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조할 수 있다.

[0036] 상기 약학 조성물은 멸균되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0037] 유효성분으로서 재조합 GIP 펩타이드 및 이의 유사체는 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.01 내지 500 mg/kg(체중), 바람직하게는 0.1 내지 50 mg/kg(체중)의 양으로 1일 1회 또는 분할하여 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여할 수 있다. 투여량은 환자의 연령, 성별, 질병의 경중에 따라 적절히 선택할 수 있다.

발명의 효과

[0038] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따라 제조된 재조합 GIP(rcGIP) 작용제는 펩타이드 분해효소 DPP-IV에 저항성이 있으며, GLP-1 및 GIP 수용체를 동시에 활성화시킬 수 있다. 따라서 본 발명의 rcGIP 작용제는 하나의 수용체에 단독으로 작용하는 작용제와는 다르게, 췌장의 베타 세포에서 효과적으로 인슐린을 분비시킬 수 있으므로, 1형 및 2형 당뇨병 치료에 매우 효과적일 것으로 사료될 뿐만 아니라, 비만 치료 및 골다공증 치료에도 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 흰쥐 GLP-1 수용체(A)와 인간 GIP 수용체(B)에 대한 GLP-1 및 GIP의 활성을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 인간 GLP-1, 익센딘-4(exendin-4) 및 인간 GIP의 아미노산 서열 비교를 나타낸 도면이다.

도 3은 GLP-1 수용체(A)와 GIP 수용체(B)에 대한 재조합 GIP(rcGIP)의 활성을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 GLP-1 수용체(A)와 GIP 수용체(B)에 대한 한 개 또는 두 개의 아미노산을 치환시킨 각각의 재조합 GIP(rcGIP)의 활성을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 GLP-1 수용체(A)와 GIP 수용체(B)에 대한 [Y^1]rcGIP, [Y^1I^7]rcGIP 및 익센딘-4(exendin-4)의 꼬리를 도입한 [Y^1]rcGIP-E4, [Y^1I^7]rcGIP-E4의 활성을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 베타 세포에서 각각의 재조합 GIP들에 의한 인슐린 분비 측정 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0041] **실시예 1. 흰쥐 GLP-1 수용체 및 인간 GLP-1 수용체에 대한 GLP-1 및 GIP 활성 측정**

[0042] 흰쥐 GLP-1 수용체 및 인간 GLP-1 수용체의 cDNA는 Dr. Bernard Thorens(Institute of Pharmacology and Toxicology, Lausanne, Switzerland)로부터 제공받았다. CRE-luc 벡터는 cyclic AMP-responsive element(CRE; TGACGTCA)가 4번 반복된 구조를 가진 프로모터와 루시퍼레이즈 유전자를 합성한 표지유전자로, Stratagene(La Jolla, CA)에서 구입하였다.

[0043] HEK 293T 세포를 37 ℃에서 10% heat-inactivated fetal bovine serum을 포함한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technologies, Grand Island, NY) 배양액에서 배양하였다. 이후, 세포를 24-웰 플레이트에 배양시키고, 수용체 플라스미드(200 ng)와 CRE-luc 플라스미드(200 ng) 및 CMV-β-galactosidase 플라스미드(200 ng)를 동시에 Effectene reagent(QUIAGEN, Chatsworth, CA)를 이용하여 세포에 도입하였다. 48 시간 후, 세포에 GLP-1, GIP, rcGIP 및 유사 펩타이드를 6 시간 동안 처리하고, 세포 추출물에서 Multi-label counter(Perkin Elmer, Wellesley, MA)를 이용하여 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 측정된 루시퍼레이즈 활성

도를 β-galactosidase 활성도로 표준화 하였다. 상기 실험을 3회 이상 반복하였으며, 1회 실험마다 각 실험군에서 3 개의 시료로부터 얻은 평균값을 사용하여 결과를 정리하였다. 실험결과는 GraphPad PRISM4 software(GraphPad, USA) 프로그램을 이용하여 비직선회기하여 시그모이드 농도 의존적 그래프를 얻었다. 또한 동일한 프로그램을 이용하여 EC_{50}(half-maximal stimulation) 또는 Emax(maximum-fold increase) 값을 구하였다. 측정 결과는 도 1에 나타내었다.

[0044] 도 1에 나타낸 바와 같이, GLP-1은 GLP-1 수용체(EC_{50}: 0.03 nM)를 발현하는 세포에서 농도 의존적으로 CRE-루시퍼레이즈 활성을 증가시켰으나, GIP 수용체를 발현하는 세포에서는 루시퍼레이즈 활성을 증가시키지 못했다. 또한, GIP는 GIP 수용체를 활성화시키는데 매우 높은 효능을 보임을 확인하였다. GIP는 매우 높은 농도(1 μM)에서 GLP-1 수용체를 활성화시킬 수 있지만, GLP-1 수용체에 대한 GIP의 효능은 GIP 수용체에 대한 효능보다 매우 낮았다. 상기의 결과로, GLP-1과 GIP는 그들 각각의 고유의 수용체에만 결합을 하고, 서로 다른 수용체에는 결합을 하지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0045] **실시예 2. 인간 GLP-1, 익센딘-4(exendin-4) 및 GIP의 아미노산 서열 비교**

[0046] GLP-1과 GIP의 활성에 중요한 아미노산 잔기를 찾고자 GLP-1과 GIP 및 독도마뱀의 침샘에서 발견된 익센딘-4(exendin-4)의 아미노산 서열을 비교하였다. 익센딘-4(exendin-4)는 GLP-1 수용체에 높은 활성을 가지는 작용제이며, GLP-1과 약 50%의 아미노산 서열 상동성을 가진다. 이와 같이, 아미노산 서열을 비교함으로써 GLP-1과 GIP 각각의 수용체와의 결합에 중요할 것이라 생각되는 아미노산 잔기를 추측할 수 있다. 펩타이드의 아미노산 서열 비교를 쉽게 하기 위해, GLP-1의 일곱 번째 잔기인 His를 GIP와 익센딘-4와 같이 첫 번째 아미노산으로 하고, 여덟 번째인 Ala를 두 번째 아미노산으로 하고, 뒤이은 아미노산 또한 이러한 방식으로 번호를 매겼다.

[0047] 도 2 및 표 1에 보이는 바와 같이, GLP-1과 익센딘-4(exendin-4) 및 GIP의 아미노 말단 부분은 높은 아미노산 상동성을 보였으며, 가운데 위치한 알파-헬릭스(α-helix) 모양을 이루는 부위와 카르복시 말단은 아미노산 서열에서 많은 차이를 보였다. 아미노 말단에서, GIP의 첫 번째(Tyr)와 일곱 번째(Ile) 아미노산이 같은 위치의 GLP-1과 익센딘-4와 차이를 보였다. 중앙의 알파-헬릭스 분위의 11번째 Ser, 22번째 Phe 및 25번째 Trp는 세 개의 펩타이드에서 모두 동일했지만, 15번째 Glu와 18번째 Ala는 GLP-1과 익센딘-4에서는 동일한 반면 GIP에서는 15번째 Asp와 18번째 His로 차이를 보였다. GIP와 GLP-1의 아미노산 비교에서, 아미노 말단의 1번째와 7번째 그리고 알파-헬릭스 부위의 15번째와 18번째 아미노산의 차이는, 이러한 아미노산들이 각각의 수용체와의 결합에서 리간드 선택성에 관여할 것이라는 것을 시사한다. 따라서 본 발명에서는 GIP에 GLP-1의 아미노산인 1번째 Tyr, 7번째 Ile, 15번째 Asp 및 18번째 His를 치환해서 재조합 GIP(rcGIP)를 제조하였다. 또한 상기 재조합 펩타이드는 DPP-IV에 대한 저항성을 주기 위하여, 2번째 아미노산을 Ser로 치환하였으며, GIP 수용체와의 결합에서 중요하지 않다고 알려진 카르복시 말단의 12 개의 아미노산을 제거하였다.

[0048] [표 1.GLP-1, GIP 및 재조합 GIP의 아미노산 서열]

	1 10 20 30 42
GLP-1	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR
rcGIP	**H**SEGTF**T**SDYTIAM**E**KI**A**QQDFVNWLLAQK
[Y^1]rcGIP	YSEGTF**T**SDYTIAM**E**KI**A**QQDFVNWLLAQK
[I^7]rcGIP	**H**SEGTFISDYTIAM**E**KI**A**QQDFVNWLLAQK
[Y^1I^7]rcGIP	YSEGTFISDYTIAM**E**KI**A**QQDFVNWLLAQK
[$D^{15}H^{18}$]rcGIP	**H**SEGTF**T**SDYTIAMDKIHQQDFVNWLLAQK
[Y^1]rcGIP-E4	YSEGTF**T**SDYTIAM**E**KI**A**QQDFVNWLLAQKGPSSGAPPPS
[Y^1I^7]rcGIP-E4	YSEGTFISDYTIAM**E**KI**A**QQDFVNWLLAQKGPSSGAPPPS
GIP	YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

[0049]

[0050] **실시예 3. 재조합 GIP(rcGIP) 펩타이드의 효능 측정**

[0051] 실시예 1에서와 같이, HEK293T 세포에서의 루시퍼레이즈 활성 시스템을 이용하여, GIP 수용체와 GLP-1 수용체에 대한 rcGIP의 효능을 측정하였다. 측정 결과는 도 3에 나타내었다.

[0052] 도 3에 나타낸 바와 같이, GIP의 1번째 Tyr, 7번째 Ile, 15번째 Asp 및 18번째 His가 GLP-1의 His, Thr, Glu 및 Ala로 치환된 재조합 GIP(rcGIP)는 GIP 및 GLP-1의 결과와 비교하여 비슷한 수준으로 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체를 활성화 시켰다. 이러한 결과는 GIP에 GLP-1의 아미노산을 치환하면, GLP-1 수용체에 대한 결합력을 높일 수 있으며, GIP 수용체 또한 여전히 활성화 시킬 수 있음을 보여준다.

[0053] 본 발명자들은 또한, GIP/GLP-1 수용체 선택성을 야기하는 아미노산 잔기를 찾기 위해, rcGIP의 하나 또는 두 개의 아미노산을 GIP의 것으로 치환하여 새로운 펩타이드를 제조한 후, 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다 (도 4).

[0054] 먼저, 첫 번째 His만을 Tyr로 치환한 rcGIP([Y^1]rcGIP)는 GIP 수용체의 활성을 매우 높였으며, 이는 GIP에 의한 활성과 비슷한 수준이었다. 그러나 GLP-1 수용체에 대한 활성은 rcGIP와 비교해서 약간 낮았다. 이러한 결과는 GIP의 1번째 아미노산인 Tyr이 GIP 수용체와의 결합과 활성에 매우 중요하다는 것과, GLP-1 수용체의 리간드 결합에 있어서 1번째 아미노산의 Tyr로의 치환은 크게 중요하지 않다는 것을 나타낸다. 그리고, 7번째 아미노산을 Ile로 치환한 rcGIP([I^7]rcGIP)의 GIP 수용체에 대한 효능은 rcGIP에 비해 약 5배 증가하였으나, GLP-1 수용체를 활성화 시키는 능력은 10배 이상 감소하였다. 이는 각각 GIP와 GLP-1의 7번째 아미노산인 Ile와 Thr이 각 수용체의 리간드 선택성을 결정하는데 주우요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

[0055] 또한 rcGIP의 1번째 아미노산을 Tyr로, 7번째 아미노산을 Ile로 동시에 치환한 rcGIP([Y^1I^7]rcGIP)의 경우, GIP 수용체에 대한 효능이 매우 높았으며, GLP-1 수용체를 활성화 시키는 능력은 매우 낮아 GIP와 비슷한 효능을 보였다. 그리고 15번째 아미노산을 Asp로, 18번째 아미노산을 His로 치환한 rcGIP([$D^{15}H^{18}$]rcGIP)은 rcGIP와 비교하여 GIP 수용체와 GLP-1를 활성화시키는데 근소한 차이를 보였다 (도 4a 및 4b). 상기의 결과로 GIP/GLP-1 펩타이드의 1번째 Tyr/His와 7번째 Ile/Thr가 GIP 수용체와 GLP-1 수용체의 리간드 선택성에 있어서 매우 중요한 역할을 한 것이라는 것을 제안할 수 있다.

[0056] **실시예 4. rcGIP에 익센딘-4(exendin-4)의 꼬리를 붙인 재조합 펩타이드의 효능 측정**

[0057] 익센딘-4(exendin-4)의 꼬리는 익센딘-4와 GLP-1 수용체의 세포외(extracellular) 부분과의 친화력을 높인다고 알려져 있다 [Al-Sabah and Donnelly, Br J Pharmacol 140:339-346, 2003]. 이러한 꼬리부분이 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대한 재조합 GIP의 효능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해, [Y^1]rcGIP와 [Y^1I^7]rcGIP에 익센딘-4의 꼬리부분의 10개 아미노산을 더하여 [Y^1]rcGIP-E4와 [Y^1I^7]rcGIP-E4를 제조하였다. 이후 상기 제조된 펩타이드에 대한 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 측정 결과는 도 5 및 표 2에 나타내었다.

[0058] 측정 결과, 익센딘-4(exendin-4) 꼬리를 가지고 있는 [Y^1]rcGIP-E4 및 [Y^1I^7]rcGIP-E4의 GLP-1 수용체 및 GIP 수용체에 대한 효능은 [Y^1]rcGIP와 [Y^1I^7]rcGIP와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다.

[0059] [표 2. GLP-1 수용체와 GIP 수용체의 리간드 선택성]

Peptide	GLP-1R		GIPR	
	EC_{50}[log, *M*]	*Emax* Fold induction	EC_{50}[log, *M*]	*Emax* Fold induction
GLP-1	-10.48±0.14	10.18±0.33	no response	no response
GIP	> -6[a]	no response	-9.79±0.16	8.87±0.39
rcGIP	-8.59±0.21[a]	10.34±0.65	-8.01±0.20[c]	9.54±0.69
[Y^1]rcGIP	-8.05±0.14[ab]	9.28±0.48	-9.58±0.20[d]	8.90±0.45
[I^7]rcGIP	-7.19±0.09[ab]	11.61±0.53	-8.68±0.18[cd]	8.61±0.42
[Y^1I^7]rcGIP	> -6[ab]	no response	-9.76±0.18[cd]	9.91±0.43
[$D^{15}H^{18}$]rcGIP	-8.22±0.13[ab]	10.48±0.47	-8.33±0.14[cd]	9.93±0.14
[Y^1]rcGIP-E4	-8.03±0.08[ab]	9.17±0.27	-10.08±0.12[cd]	9.03±0.25
[Y^1I^7]rcGIP-E4	>-6[ab]	no response	-9.93±0.16[cd]	9.90±0.38

[a]: Versus GLP-1 toward GLP-1R ($p < 0.05$)
[b]: Versus rcGIP toward GLP-1R ($p < 0.05$)
[c]: Versus GIP toward GIPR ($p < 0.05$)
[d]: Versus rcGIP toward GIPR ($p < 0.05$)

[0060]

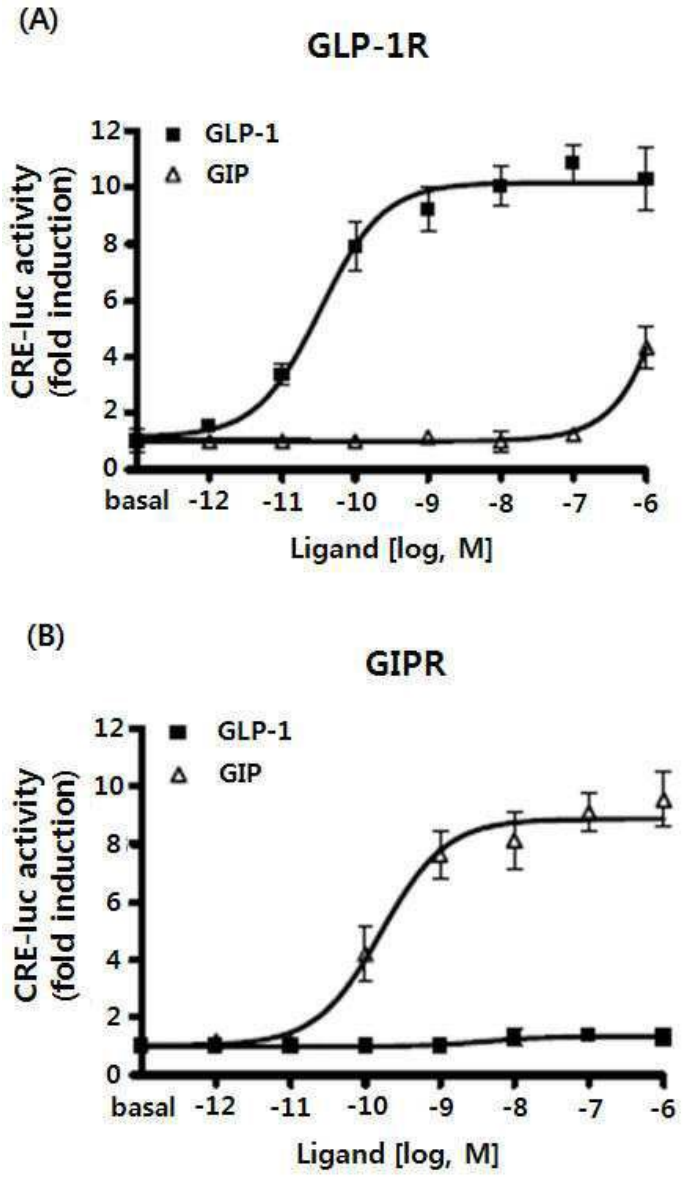
[0061] **실시예 5. 췌장의 베타 세포에서 재조합 GIP들에 의한 인슐린 분비**

[0062] 랫트에서 유래한 췌장 베타 세포인 INS-1 세포를 2×10^5/well 배양하면서, 16.7 mM의 글루코스를 처리하거나, 글루코스 16.7 mM이 있는 상태에서 1 μM의 GLP-1, GIP 및 재조합 GIP들을 처리한 후, 인슐린 분비를 인슐린 검출 키트(rat/mouse insulin ELISA kit, Linco Research, St Charles, Missouri, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정 결과는 도 6에 나타내었다.

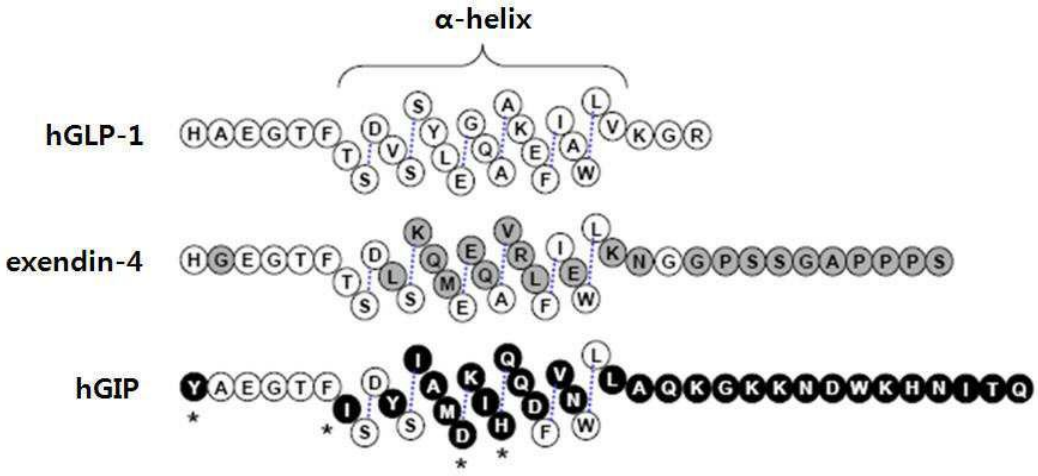
[0063] 측정 결과, 1.67 mM 글루코스가 있는 상태에서 GLP-1과 GIP 및 재조합 GIP 모두 효과적으로 인슐린 분비를 촉진시킴을 확인하였다.

도면

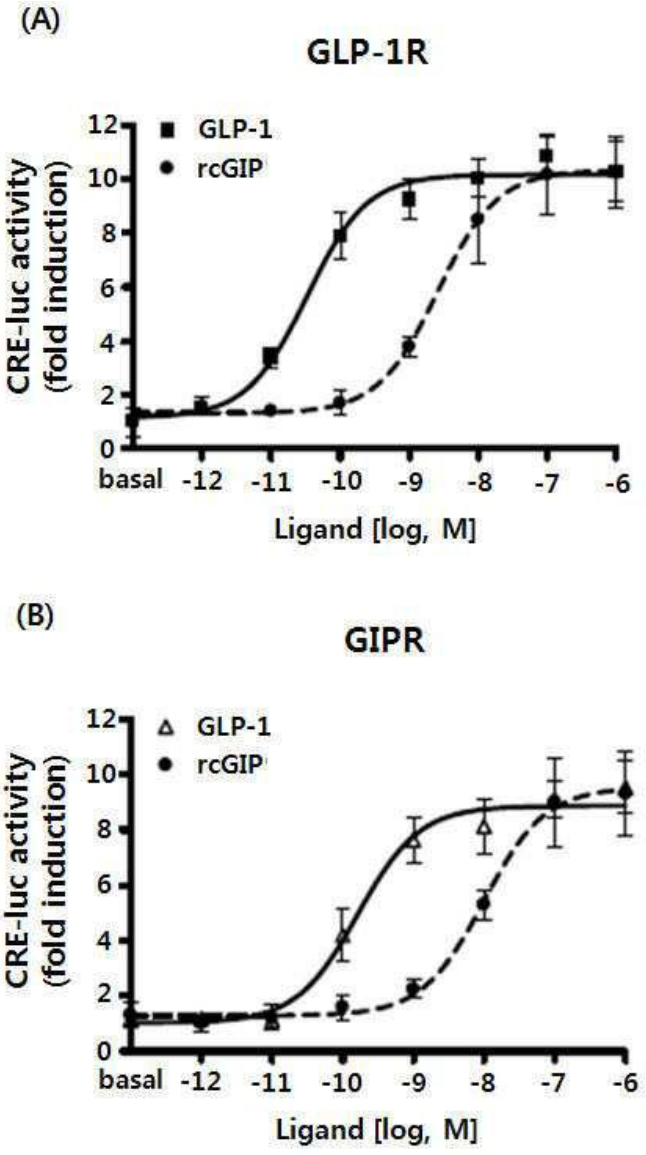
도면1


(A)
GLP-1R
GLP-1
GIP
CRE-luc activity
(fold induction)
12
10
8
6
4
2
0
basal
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Ligand [log, M]
(B)
GIPR
GLP-1
GIP
CRE-luc activity
(fold induction)
12
10
8
6
4
2
0
basal
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Ligand [log, M]

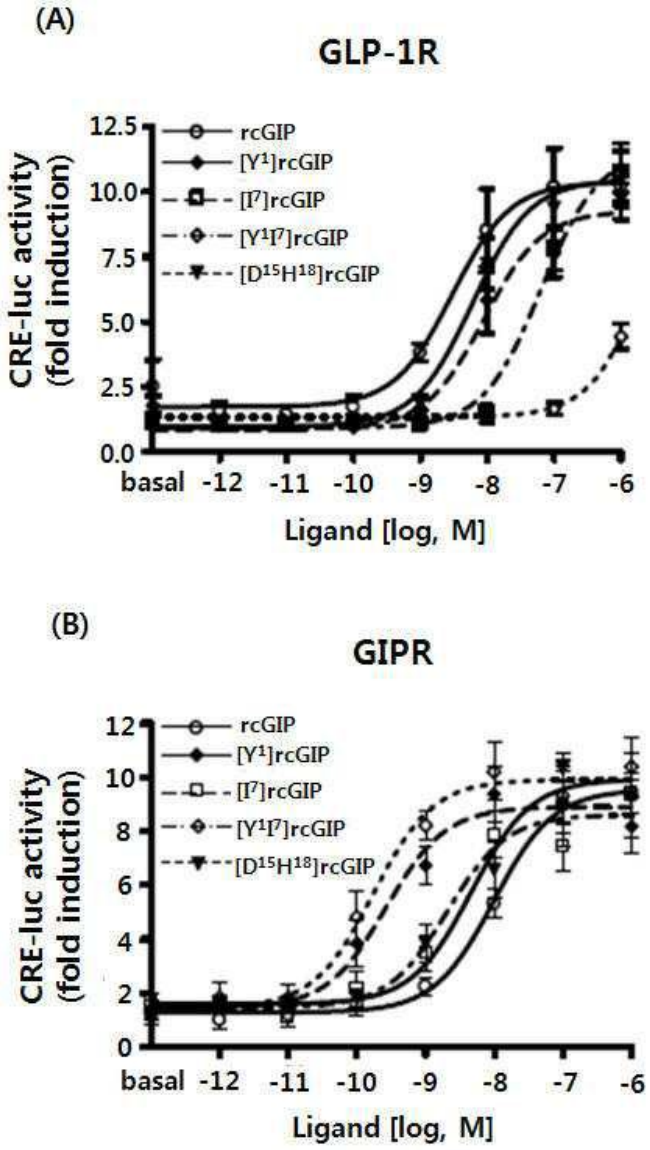
도면2


α-helix
hGLP-1
exendin-4
hGIP

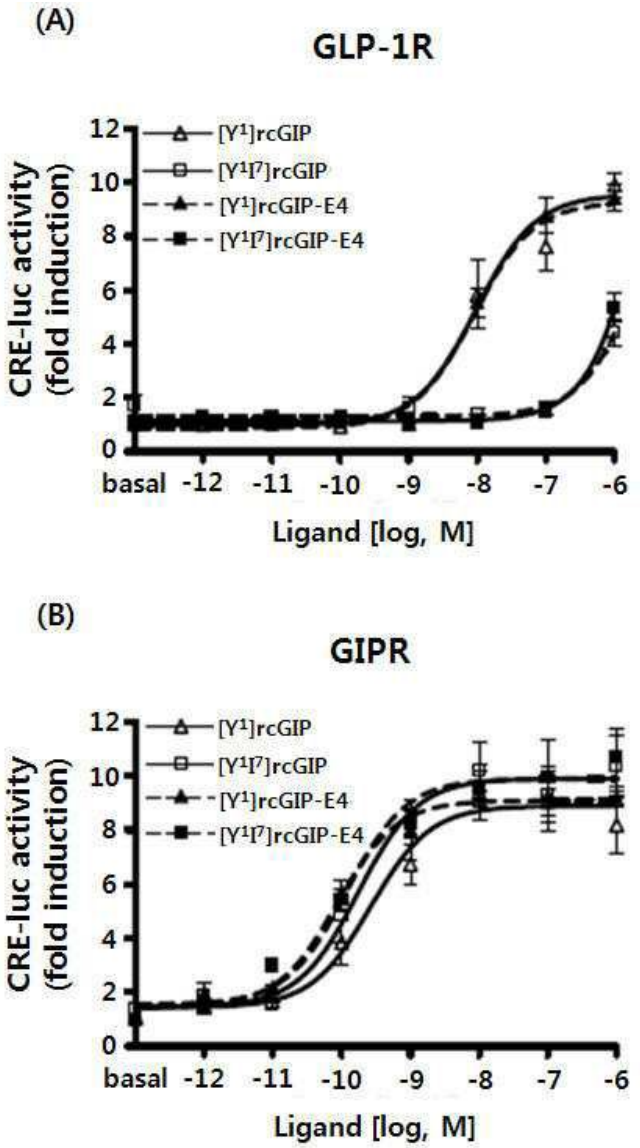
도면3


(A)
GLP-1R
GLP-1
rcGIP
CRE-luc activity (fold induction)
basal -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Ligand [log, M]
(B)
GIPR
GLP-1
rcGIP
CRE-luc activity (fold induction)
basal -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Ligand [log, M]

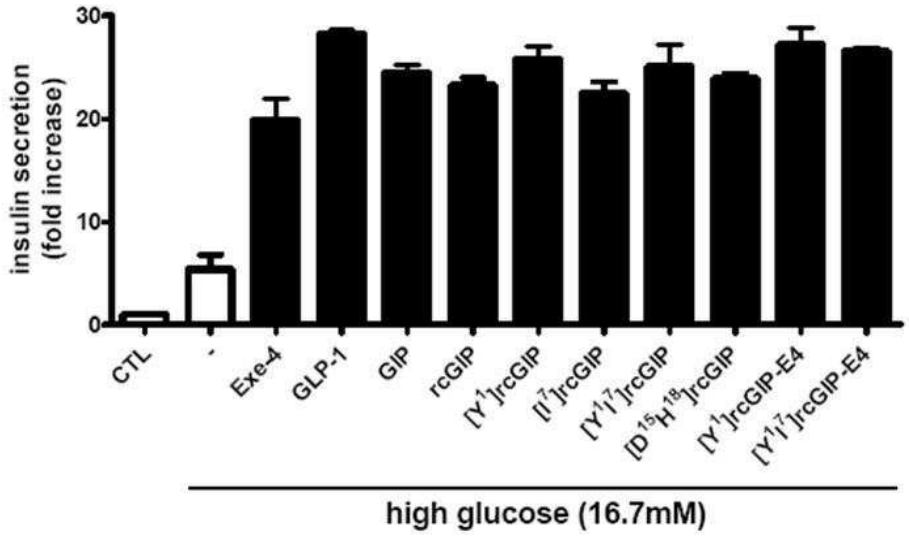
도면4


(A)
GLP-1R
CRE-luc activity (fold induction)
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
rcGIP
[Y1]rcGIP
[I7]rcGIP
[Y1I7]rcGIP
[D15H18]rcGIP
basal -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Ligand [log, M]
(B)
GIPR
CRE-luc activity (fold induction)
12
10
8
6
4
2
0
rcGIP
[Y1]rcGIP
[I7]rcGIP
[Y1I7]rcGIP
[D15H18]rcGIP
basal -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Ligand [log, M]

도면5


(A)
GLP-1R
CRE-luc activity (fold induction)
[Y1]rcGIP
[Y1I7]rcGIP
[Y1]rcGIP-E4
[Y1I7]rcGIP-E4
basal -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Ligand [log, M]
(B)
GIPR
CRE-luc activity (fold induction)
[Y1]rcGIP
[Y1I7]rcGIP
[Y1]rcGIP-E4
[Y1I7]rcGIP-E4
basal -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Ligand [log, M]

도면6


insulin secretion (fold increase)
CTL
-
Exe-4
GLP-1
GIP
rcGIP
[Y1]rcGIP
[I7]rcGIP
[Y1I7]rcGIP
[D15H18]rcGIP
[Y1]rcGIP-E4
[Y1I7]rcGIP-E4
high glucose (16.7mM)

서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부